



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup>:

C12N 15/86, 5/10, A61K 48/00

A1

(11) Numéro de publication internationale:

WO 95/14785

(43) Date de publication internationale:

1er juin 1995 (01.06.95)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/01359

(22) Date de dépôt international: 22 novembre 1994 (22.11.94)

(30) Données relatives à la priorité:

93/13977

23 novembre 1993 (23.11.93)

FR

(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BEUZARD, Yves [FR/FR]; 7, rue de Villersexel, F-75007 Paris (FR). DANOS, Olivier [FR/FR]; 3, avenue Lyautey, F-92380 Garches (FR). DESCAMPS, Vincent [FR/FR]; 3, square Montecristo, F-78160 Marly-le-Roi (FR). HEARD, Jean-Michel [FR/FR]; 25, avenue Reille, F-75014 Paris (FR). MOULLIER, Philippe [FR/FR]; 20, rue de Rushmoor, F-92100 Meudon (FR). NAFFAKH, Nadia [FR/FR]; 35, rue Galliéni, F-92240 Malakoff (FR). PERRICAUDET, Michel [FR/FR]; 31, rue de Chartes, F-28320 Ecroisses

(FR). VAINCHENKER, William [FR/FR]; 7, rue Geoffroy Saint-Hilaire, F-75005 Paris (FR).

(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).

(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, FI, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LT, LV, MD, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: COMPOSITION FOR THE IN VIVO PRODUCTION OF THERAPEUTIC PRODUCTS

(54) Titre: COMPOSITION POUR LA PRODUCTION DE PRODUITS THERAPEUTIQUES IN VIVO

(57) Abstract

The present invention provides cell compositions for in vivo implantation, and designed for the sustained and controlled delivery of therapeutic substances.

(57) Abrégé

La présente invention concerne des compositions cellulaires destinées à être implantées in vivo, pour délivrer de manière prolongée et contrôlée des substances thérapeutiques.

# UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brazil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Biélorussie	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LJ	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	République fédérale d'Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
ES	Espagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
FI	Finlande	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

COMPOSITION POUR LA PRODUCTION DE PRODUITS  
THERAPEUTIQUES IN VIVO

La présente invention concerne le domaine de la thérapie génique et cellulaire. Plus particulièrement, elle concerne des compositions cellulaires destinées à être  
5 implantées in vivo, pour délivrer de manière prolongée et contrôlée des substances thérapeutiques.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anomalie (mutation, expression aberrante, etc) par introduction d'une information génétique dans un organisme affecté. Cette information génétique peut être introduite soit in  
10 vitro dans une cellule extraite de l'organisme, la cellule modifiée étant alors réintroduite dans l'organisme, soit directement in vivo dans le tissu approprié. Différentes techniques ont été décrites pour l'introduction de cette information génétique, parmi lesquelles des techniques diverses de transfection impliquant des complexes d'ADN et de DEAE-dextran [Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891], d'ADN  
15 et de protéines nucléaires [Kaneda et al., Science 243 (1989) 375], d'ADN et de lipides [Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413], l'emploi de liposomes [Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431], etc. Plus récemment, l'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de gènes est apparu comme une alternative prometteuse à ces techniques physiques de transfection. A cet égard, différents virus ont été testés  
20 pour leur capacité à infecter certaines populations cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus.

Les techniques impliquant l'administration directe du gène in vivo présentent certains inconvénients, tels que la dispersion non sélective du gène dans tout  
25 l'organisme, sa faible demi-vie, les risques de réaction immunologique, ou encore le manque de contrôle du gène après injection. Pour cette raison, la thérapie cellulaire offre une alternative intéressante, consistant à prélever les cellules, à les modifier ex vivo, puis à les réadministrer. De ce fait, seule une population de cellules identifiée est modifiée par le gène thérapeutique. Toutefois, après administration, le devenir des  
30 cellules modifiées n'est pas contrôlé. De même, il n'est plus possible d'arrêter le traitement. Enfin, cette thérapie implique que les cellules à traiter puissent être prélevées de l'organisme, manipulées ex vivo, et facilement réimplantées. De ce fait, elle est pratiquement limitée aux cellules du sang.

La présente invention apporte une solution avantageuse à ces problèmes. La  
35 présente invention concerne en effet des compositions destinées à être implantées dans

un organisme, comprenant des cellules modifiées par un adénovirus recombinant comprenant une séquence d'ADN hétérologue codant pour un produit thérapeutique, un gélifiant, et un support sur lequel sont ancrées lesdites cellules.

5 L'implantation des compositions selon l'invention offre de nombreux avantages par rapport à l'art antérieur, et en particulier le contrôle du nombre de cellules implantées, le contrôle du nombre de cellules infectées, la mesure du taux d'expression du gène thérapeutique avant implantation, l'absence de réaction immuno-

10 L'implantation de cellules modifiées génétiquement a déjà été envisagée dans l'art antérieur. Ainsi, Palmer et al. [PNAS 88 (1991) 1330] et Moullier et al. [Nature genetics 4 (1993) 154] ont décrit l'implantation de fibroblastes modifiés génétiquement par des rétrovirus. Toutefois, l'utilisation de rétrovirus pose certains problèmes limitant les applications de cette technologie. Notamment, les rétrovirus sont difficiles à  
15 produire avec des titres élevés, et, de ce fait, ne permettent pas l'utilisation à des multiplicités d'infections élevées. Les rétrovirus présentent également l'inconvénient de ne pas pouvoir incorporer de fragments d'ADN hétérologue de taille importante, limitant de ce fait les applications thérapeutiques. Enfin, les rétrovirus s'intègrent dans le génome des fibroblastes, ce qui peut contribuer à l'apparition de cellules tumorales  
20 après implantation. Par ailleurs, les fibroblastes décrits par Palmer et al. sont enrobés uniquement dans du collagène, et les implants obtenus n'ont pas une cohésion suffisante. De ce fait, ils se désagrègent progressivement in vivo, entraînant une diffusion incontrôlée des cellules hors du site d'implantation.

Les compositions selon l'invention permettent de résoudre ces inconvénients.  
25 La présente invention résulte en partie de la mise en évidence que les adénovirus sont capables in vitro d'infecter avec des pouvoirs très élevés des cellules en culture. Ainsi, il est possible d'infecter 100 % des fibroblastes en culture. Par ailleurs, il est également possible, en variant la multiplicité d'infection, d'obtenir un nombre de copies élevé d'adénovirus par cellule (jusqu'à 100 copies), ce qui permet d'augmenter l'effet  
30 thérapeutique des implants de l'invention de manière importante. De plus, les adénovirus de l'invention peuvent être produits avec des titres élevés, ce qui permet d'infecter non seulement des cultures primaires de cellules, mais également des cultures secondaires, préalablement clonées et conservées. Les adénovirus de l'invention présentent également l'avantage de ne pas s'intégrer dans le génome des cellules qu'ils  
35 infectent. De ce fait, les implants de l'invention sont moins susceptibles d'induire

l'apparition de cellules tumorales. De plus, si les cellules implantées se divisent, l'adénovirus de l'invention sera dilué au cours des générations, et le caractère qu'il confère aux cellules infectées ne sera pas transmis aux cellules filles. Enfin, les vecteurs adénoviraux utilisés dans la présente invention peuvent être modifiés de façon à

5 incorporer des fragments d'ADN hétérologue de très grande taille. Ainsi, contrairement aux autres vecteurs viraux, il est par exemple possible d'incorporer un gène hétérologue de grande taille tel celui du facteur VIII ou de la dystrophine. De plus, il est possible d'incorporer, en plus du gène thérapeutique, un gène de sécurité dont l'expression permettrait par exemple de détruire la cellule infectée.

10 Les compositions selon l'invention présentent donc de nombreux avantages par rapport aux systèmes décrits dans l'art antérieur, qui leur confèrent des potentialités thérapeutiques très supérieures.

Les compositions selon l'invention peuvent être réalisées à partir de différents types de cellules, et notamment à partir de fibroblastes, de cellules endothéliales,

15 épithéliales, gliales, d'hépatocytes, de kératinocytes ou encore de myoblastes. Préférentiellement, on utilise dans le cadre de l'invention des fibroblastes.

Dans un mode préféré de réalisation de l'invention, on utilise des cellules autologues, c'est-à-dire prélevées à partir du patient chez lequel elles seront ensuite implantées. Cependant, dans certains cas, il peut être intéressant d'utiliser des cellules

20 allogéniques ou xénogéniques, entraînant un rejet progressif de l'implant et ainsi, lui donnant un effet limité dans le temps. En particulier, des cellules d'origine murine peuvent être implantées chez l'homme sans autre effet que le rejet progressif.

Les cellules utilisées dans le cadre de l'invention peuvent être des cultures primaires. Dans ce cas, elles peuvent être prélevées par toute technique connue de

25 l'homme du métier, puis mises en culture dans des conditions permettant leur prolifération. S'agissant plus particulièrement de fibroblastes, ceux-ci peuvent être aisément obtenus à partir de biopsies, par exemple selon la technique décrite par Ham [Methods Cell.Biol. 21a (1980) 255]. Ces cellules peuvent être utilisées directement pour la préparation des compositions de l'invention, ou conservées, par exemple par

30 congélation, pour l'établissement de banques autologues, en vue d'une utilisation ultérieure. Préférentiellement, les compositions selon l'invention comprennent  $10^5$  à  $10^{10}$  cellules. Plus préférentiellement, elles en comprennent  $10^6$  à  $10^8$ .

Les cellules en culture sont ensuite infectées par des adénovirus recombinants, pour leur conférer des propriétés thérapeutiques recherchées.

35 L'infection est réalisée in vitro selon des techniques connues de l'homme du métier. En

particulier, selon le type de cellules utilisé et le nombre de copies de virus par cellule désiré, l'homme du métier peut adapter la multiplicité d'infection et éventuellement le nombre de cycles d'infection réalisé. Il est bien entendu que ces étapes doivent être effectuées dans des conditions de stérilité appropriées pour une administration in vivo des compositions obtenues.

Les doses d'adénovirus recombinant utilisées pour l'infection des cellules peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du type cellulaire, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont utilisés pour l'infection à des doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu/ml, et de préférence  $10^6$  à  $10^{10}$  pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée (par exemple la lignée 293), et mesure, généralement après 2 à 4 jours, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

Les adénovirus recombinants utilisés dans le cadre de la présente invention sont préférentiellement défectifs, c'est-à-dire incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule infectée. Généralement, le génome des adénovirus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la répllication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par la séquence d'ADN hétérologue. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Néanmoins, ces virus ne sont pas pathogènes pour l'homme, et notamment les sujets non immuno-déprimés. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande FR 93 05954). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, [exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81], ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus

préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple].

De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine, canine ou mixte, c'est-à-dire comprenant des régions issues d'un adénovirus humain et des régions issues d'un adénovirus canin.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier [Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917]. En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la séquence d'ADN hétérologue. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 [Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59] qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). Des stratégies de construction de vecteurs dérivés des adénovirus ont également été décrites dans les demandes n° FR93 05954 et FR 93 08596 qui sont incorporées à la présente demande par référence.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

Comme indiqué ci-dessus, les adénovirus recombinants utilisés dans le cadre de la présente invention comprennent une séquence d'ADN hétérologue codant pour un produit thérapeutique. Le produit thérapeutique peut être tout ARN, peptide, polypeptide ou protéine dont la production dans l'organisme est recherchée.

De préférence, la séquence d'ADN hétérologue comprend également des signaux d'expression permettant la production du produit thérapeutique dans les cellules infectées. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression de ce produit thérapeutique lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du

génomique d'un virus, y compris l'adénovirus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs E1A, MLP, CMV, RSV, PGK, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc. Par ailleurs, lorsque le gène inséré ne comporte pas de séquences d'expression, il peut être inséré dans le génome du virus défectif en aval d'une telle séquence.

Plus préférentiellement, la séquence d'ADN hétérologue comprend des signaux permettant la production et la sécrétion du produit thérapeutique par les cellules infectées implantées. En effet, la néo-vascularisation des implants selon l'invention permet une libération particulièrement efficace des produits thérapeutiques dans la circulation, libération qui est de plus prolongée et contrôlée. A cet effet, la séquence d'ADN hétérologue comporte généralement, en amont du gène thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule infectée. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle dans la cellule infectée, ou d'une séquence signal artificielle.

Avantageusement, le produit thérapeutique est choisi parmi les enzymes (tels que notamment la superoxyde dismutase, la catalase, les amylases, les lipases, les amidases, la chymosine, etc), les dérivés sanguins (tels que la sérum-albumine, l'alpha- ou la bêta-globine, le facteur VII, le facteur VIII, le facteur IX, le facteur de von Willebrand, la fibronectine, l'alpha-1 antitrypsine, etc), l'insuline et ses variants, les lymphokines (telles que les interleukines, les interférons, les facteurs de stimulation des colonies [G-CSF, GM-CSF, M-CSF, SCF, ...], le TNF, le TRF, etc), les facteurs de croissance (tels que l'hormone de croissance, l'érythropoïétine, l'hormone para-thyroïdienne, le FGF, l'EGF, le PDGF, le TGF, le BDNF, le NGF, le CNTF, etc), les apolipoprotéines, ou encore des polypeptides antigéniques pour la réalisation de vaccins (hépatite, cytomégalovirus, Epstein-Barr, herpes, etc).

Comme indiqué ci-dessus, les implants selon l'invention sont particulièrement avantageux en ce sens qu'ils permettent de contrôler la libération du produit thérapeutique dans l'organisme : Celle-ci est tout d'abord déterminée par la multiplicité d'infection et par le nombre de cellules implantées. Ensuite, la libération peut être contrôlée soit par le retrait de l'implant, ce qui arrête définitivement le traitement, soit par l'utilisation de systèmes d'expression régulables, permettant d'induire ou de réprimer l'expression des gènes thérapeutiques.



Pour la préparation des compositions selon l'invention, différents types de gélifiants peuvent être employés. Les gélifiants sont utilisés pour favoriser l'ancrage des cellules sur le support par inclusion des cellules dans une matrice ayant la constitution d'un gel. Différents agents d'adhésion cellulaire peuvent donc être utilisés, tels que notamment le collagène, la gélatine, les glycosaminoglycans, la fibronectine, les lectines, etc. De préférence, on utilise dans le cadre de la présente invention du collagène. Il peut s'agir de collagène d'origine humaine, bovine ou murine. Plus préférentiellement, on utilise du collagène de type I ou III.

Comme indiqué ci-avant, les compositions selon l'invention comprennent également un support permettant l'ancrage des cellules. Le terme ancrage désigne toute forme d'interaction biologique et/ou chimique et/ou physique entraînant l'adhésion et/ou la fixation des cellules sur le support. Par ailleurs, les cellules peuvent soit recouvrir le support utilisé, soit pénétrer à l'intérieur de ce support, soit les deux. On préfère utiliser dans le cadre de l'invention un support solide, non toxique et/ou bio-compatibles. En particulier, on peut utiliser des fibres de polytétrafluoroéthylène (PTFE). Dans un mode particulier de mise en oeuvre de l'invention, on utilise un support d'origine biologique, tel que notamment le collagène réticulé, la poudre d'os, les polymères à base d'hydrates de carbone et les supports à base de calcaire.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'une composition telle que définie précédemment selon lequel on effectue les étapes suivantes :

- a) on prélève un échantillon de tissu à partir d'un organisme,
- b) on isole et cultive in vitro les cellules désirées (fibroblastes, cellules endothéliales, épithéliales, gliales, hépatocytes, kératinocytes, myoblastes, etc),
- c) on infecte les cellules obtenues en b) avec un adénovirus recombinant comprenant une séquence d'ADN hétérologue codant pour un produit thérapeutique,
- d) on incube les cellules infectées avec un milieu contenant un gélifiant,
- e) on dépose le mélange obtenu en d) sur un support, éventuellement après recouvrement de celui-ci par le gélifiant,
- f) on incube le mélange obtenu en e) dans des conditions permettant la gélification du gélifiant et l'ancrage des cellules sur le support, et
- g) on récupère la composition obtenue qui constitue l'implant utilisable pour l'implantation.

Comme indiqué précédemment, les étapes a) et b) du procédé peuvent être évitées si l'on travaille à partir de cultures secondaires de cellules ou à partir de cellules extraites de banques cellulaires. Plus préférentiellement, avant l'étape d), les cellules infectées sont lavées plusieurs fois. Ensuite, pour la préparation de l'implant, les cellules infectées sont cultivées en présence du gélifiant, puis, lorsque la matrice est formée, elle est déposée sur le support éventuellement après mise en contact de celui-ci avec le gélifiant. De plus, les cellules ou le support peuvent être mis en présence également de facteurs de croissance, tels que des facteurs angiogéniques, favorisant la formation de l'implant. Dans ce cas, des traces de facteur de croissance peuvent subsister dans l'implant. Le mélange support/gélifiant/cellules est ensuite incubé pendant une période suffisante pour permettre la gélification du gélifiant, puis la matrice ainsi obtenue est maintenue dans du milieu de culture pour permettre aux cellules de s'ancrer sur le support. L'implant ainsi préparé peut être implanté directement dans l'organisme.

Des méthodes de préparation d'implants ont également été décrites par Moullier et al [Nature Genetics 4 (1993) 154] qui peuvent être adaptées par l'homme du métier aux implants selon l'invention (voir aussi FR 93 09185 et FR 93 04700).

L'invention concerne également une méthode pour le traitement de maladies comprenant l'implantation d'une composition telle que définie ci-avant capable de produire un produit thérapeutique apte à corriger ladite maladie. Préférentiellement, cette méthode est applicable au traitement de maladies résultant d'une déficience en un produit thérapeutique et l'implant est capable de produire ledit produit. Encore plus préférentiellement, la méthode selon l'invention est utilisable pour le traitement de la thalassémie, de déficiences en érythropoïétine (insuffisance rénale, etc), en hormone de croissance, en apolipoprotéines, en hormone thyroïdienne, en facteurs de coagulation, etc. Avantagusement, la méthode selon l'invention comprend l'implantation au niveau de la cavité péritonéale, dans le tissu sous-cutané (région sus-pubienne, fosses iliaques ou inguinales, etc), dans un organe, un muscle, une tumeur, le système nerveux central, ou encore sous une muqueuse.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

## EXEMPLES

### **1. Techniques générales**

#### 1.1. Isolement et culture de fibroblastes

- Les fibroblastes ont été obtenus à partir de biopsies cutanées réalisées dans des conditions stériles. Pour cela, un ou plusieurs fragments de peau sont prélevés, hachés et soumis à une digestion enzymatique. A cet effet, les lambeaux sont incubés à 37°C sous agitation douce dans un milieu DMEM supplémenté par 2 mM de L-glutamine, de la streptomycine et du sérum de veau fœtal (250 µg/ml). Au bout de 2 heures, la solution est centrifugée à 1500 t/mn et le culot cellulaire est lavé 2 fois dans le même milieu dépourvu d'enzymes. Les cellules sont ensuite comptées et ensemencées, à raison de  $4 \cdot 10^6$  cellules vivantes/flacon, dans des flacons contenant environ 25 ml du même milieu.

#### 1.2. Infection des fibroblastes par un adénovirus recombinant

- L'infection des fibroblastes avec un adénovirus recombinant est avantageusement effectuée avec une solution d'adénovirus purifiée, par exemple sur chlorure de césium (Cf exemple 2.2.). L'intérêt d'un tel protocole réside notamment dans le fait que, contrairement aux rétrovirus, un seul cycle d'infection suffit pour obtenir un pourcentage très élevé de cellules infectées (jusqu'à 100 %). De plus, l'intérêt des adénovirus réside également dans le fait que des multiplicités d'infection très grandes peuvent être employées (1000 pfu par cellule par exemple).

- Généralement, les cellules à confluence sont incubées en présence d'une solution concentrée renfermant une quantité déterminée d'adénovirus recombinant. La multiplicité d'infection peut être adaptée par l'homme du métier en fonction des cas. Au bout d'une heure environ, du surnageant de culture est ajouté et les cellules sont maintenues pour la nuit. Ensuite, les cellules sont lavées dans un milieu dépourvu de virus, récoltées et de nouveau lavées. Les cellules sont ensuite incorporées dans le milieu contenant le gélifiant. Le pourcentage d'infection est alors contrôlé. Bien que cela ne soit généralement pas nécessaire, il est ensuite possible d'effectuer d'autres cycles d'infection pour augmenter le nombre de copies par cellules. Par ailleurs, ce protocole peut être appliqué à d'autres types cellulaires tels que les cellules endothéliales, épithéliales, gliales, les hépatocytes, les kératinocytes ou les myoblastes.

### 1.3. Préparation des implants

Le support utilisé (support synthétique ou biologique) est stérilisé, de préférence par autoclavage, puis recouvert de collagène de type I. Plus particulièrement, s'agissant de fibres de polytétrafluoroéthylène (Gore et Associates), l'addition de collagène est effectuée en plongeant pendant 1 heure environ les fibres dans une solution comportant du collagène [solution d'acide acétique 0,1N contenant 0,1 % de collagène de rat (sigma)]. De préférence, cette opération est réalisée sous vide afin de chasser l'air présent dans les fibres. Le support ainsi obtenu, recouvert d'un film de collagène, est transféré dans des boîtes de pétri et séché. Ensuite, une solution comprenant des facteurs de croissance dilués dans un tampon phosphate est ajoutée (10-20 ng de FGF basique pour 50 mg de fibres). Le support est ensuite placé dans des puits ou boîtes dont la taille correspond à celle des implants recherchés. Les cellules infectées par les adénovirus recombinants sont mises en suspension dans du milieu RPMI comprenant du collagène et du FGF basique. Cette suspension cellulaire est alors déposée sur le support. Après gélification du collagène (environ 30 minutes à 37°C sous 5 % CO<sub>2</sub>), les lattices de gel sont détachées des puits à l'aide d'une aiguille, puis maintenues à température ambiante 48 à 96 heures selon la vitesse de rétraction (le milieu est changé au bout de 48 heures). La composition obtenue est prête à être implantée.

### 1.4. Implantation

Les compositions décrites ci-dessus sont implantées sous anesthésie dans les zones intrapéritonéales mieux vascularisées, par exemple au niveau du tablier épiploïque. Un ou plusieurs implants peuvent être introduits dans le même organisme au même site ou en des sites différents (jusqu'à 10 par exemple, selon le gène thérapeutique, la pathologie, la taille des implants, etc). Après implantation, il est possible de réaliser une bourse de manière à maintenir le ou les implants, et à faciliter leur excision. Généralement, des connexions vasculaires s'établissent dès les premiers jours, permettant une libération efficace du produit thérapeutique.

Il est également possible d'implanter les compositions de l'invention dans le tissu sous-cutané (région sus-pubienne, fosses iliaques ou inguinales, etc), dans un organe, un muscle ou encore sous une muqueuse.

## 2. Construction d'un adénovirus recombinant comprenant une séquence d'ADN hétérologue codant pour l'érythropoïétine.

L'érythropoïétine (Epo) est une hormone spécifique de la prolifération terminale et de la différenciation des précurseurs des globules rouges. Son gène a été cloné, séquencé, et exprimé in vitro (EP 148 605). L'Epo recombinante est largement utilisée pour remplacer le déficit de production par le rein, en cas d'insuffisance rénale chronique. A forte dose, l'Epo a également un intérêt thérapeutique potentiel pour les anémies génétiquement déterminées ( $\beta$  thalassémie, déranocytose) et certains déficits de l'hématopoïèse. Pour l'ensemble de ces applications, la production prolongée et contrôlée d'Epo au moyen d'un implant selon l'invention constitue un progrès important et permet de réduire les coûts prohibitifs des doses élevées d'Epo recombinante.

### 2.1. Construction du plasmide pAd.RSV.Epo

Le plasmide pAd.RSV.Epo a été construit à partir du plasmide pAd.RSV.BGal [Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. (1992) 626] par substitution du gène  $\beta$ -gal par le gène de l'Epo.

Pour cela, le cDNA codant pour l'Epo de singe et contenant son propre signal de sécrétion a été isolé à partir du plasmide Bluescript sous forme d'un fragment XhoI-EcoRV. Ce fragment a ensuite été cloné aux sites SalI (situé après le LTR RSV) et EcoRV (situé avant PIX de l'Ad5) du vecteur pAd.RSV.BGal, résultant en la substitution du gène Bgal par le cDNA de l'Epo.

### 2.2. Construction de l'adénovirus recombinant défectif Ad.RSV.Epo

L'adénovirus Ad-RSV.Epo a été obtenu par recombinaison homologue in vivo entre l'adénovirus mutant Ad.dl1324 [Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543] et le vecteur pAd.RSV.Epo.

Pour cela, le plasmide pAd.RSV.Epo et l'adénovirus Ad.dl1324 linéarisé par l'enzyme ClaI, ont été co-transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés ont été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant a été amplifié dans la lignée cellulaire 293, conduisant à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ  $10^{10}$  pfu/ml.

Les particules virales sont généralement purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'adénovirus Ad.RSV.Epo peut être conservé à -80°C dans 20 % de glycérol.

5    3. Préparation d'un implant comprenant des fibroblastes infectés par l'adénovirus recombinant Ad.RSV.Epo, du collagène et des fibres de polytétrafluoroéthylène (PTFE).

10    Les fibroblastes ( $10^7$  cellules/ml) préparés à partir de la peau de souris DBA2J selon le protocole décrit dans l'exemple 1.1. ont été infectés à confluence avec l'adénovirus Ad.RSV.Epo purifié sur gradient de chlorure de césium comme décrit dans l'exemple 2 (1 seul cycle d'infection). Deux conditions d'infection ont été utilisées, correspondant à deux titres :  $10^8$  et  $10^9$  pfu, soit une multiplicité d'infection de 10 et 100 respectivement.

15    24 heures après l'infection, les cellules ont été lavées, trypsinisées puis récoltées. Après un nouveau lavage, 4 implants ont été préparés selon le protocole décrit dans l'exemple 1.3., comprenant  $10^7$  cellules chacun (2 implants pour chaque titre viral).

20    Les implants obtenus au bout de 72 heures de culture ont été prélevés puis implantés dans le péritoine de 2 souris DBA2J de 8 semaines selon le protocole décrit dans l'exemple 1.4. (2 implants par souris). La souris 1 contient les 2 implants réalisés avec les fibroblastes infectés avec un titre viral de  $10^9$  pfu. La souris 2 contient les 2 implants réalisés avec les fibroblastes infectés avec un titre viral de  $10^8$  pfu.

25    L'expression de l'Epo in vivo a été dosée dans le sang et son effet a été déterminé par mesure de l'élévation de l'hématocrite qui reflète l'action physiologique de l'Epo, c'est-à-dire l'augmentation du nombre de globules rouges. Pour cela, des échantillons de sang sont prélevés par ponctions au niveau du sinus rétroorbital au moyen d'un tube de microhématocrite, puis centrifugés dans une centrifugeuse de microhématocrite. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 1. Ils montrent  
30    clairement que les implants selon l'invention induisent une augmentation importante et dose-dépendante de l'hématocrite.

REVENDEICATIONS

1. Composition destinée à être implantée dans un organisme caractérisée en ce qu'elle comprend des cellules modifiées par un adénovirus recombinant comprenant une séquence d'ADN hétérologue codant pour un produit thérapeutique, un gélifiant, et un support sur lequel sont ancrées lesdites cellules.  
5
2. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que les cellules sont choisies parmi les fibroblastes, les cellules endothéliales, épithéliales, gliales, les hépatocytes, les kératinocytes et les myoblastes.
3. Composition selon la revendication 2 caractérisée en ce que les cellules  
10 sont des fibroblastes.
4. Composition selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que les cellules sont autologues vis-à-vis de l'organisme dans lequel elles sont destinées à être implantées.
5. Composition selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisée en ce que  
15 l'adénovirus est un adénovirus d'origine humaine, canine ou mixte.
6. Composition selon la revendication 5 caractérisée en ce que l'adénovirus est obtenu à partir des adénovirus Ad2, Ad5 ou CAV2.
7. Composition selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisée en ce que l'adénovirus est défectif.
8. Composition selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisée en ce que le  
20 produit thérapeutique est choisi parmi les ARN, peptides, polypeptides et protéines.
9. Composition selon la revendication 8 caractérisée en ce que la séquence d'ADN hétérologue comprend des signaux permettant la production et la sécrétion du produit thérapeutique.
10. Composition selon les revendications 8 et 9 caractérisée en ce que le  
25 produit thérapeutique est choisi parmi les enzymes (tels que notamment la superoxyde dismutase, la catalase, les amylases, les lipases, les amidases, la chymosine, etc), les dérivés sanguins (tels que la sérum-albumine, l'alpha- ou la bêta-globine, le facteur VII, le facteur VIII, le facteur IX, le facteur de von Willebrand, la fibronectine,

- l'alpha-1 antitrypsine, etc), l'insuline et ses variants, les lymphokines (telles que les interleukines, les interférons, les facteurs de stimulation des colonies [G-CSF, GM-CSF, M-CSF, SCF, ...], le TNF, le TRF, etc), les facteurs de croissance (tels que l'hormone de croissance, l'érythropoïétine, l'hormone para-thyroïdienne, le FGF, l'EGF, le PDGF, le TGF, le BDNF, le NGF, le CNTF, etc), les apolipoprotéines, ou encore des polypeptides antigéniques pour la réalisation de vaccins (hépatite, cytomégalovirus, Epstein-Barr, herpes, etc).

11. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que le gélifiant est choisi parmi le collagène, la gélatine, les glycosaminoglycans, la fibronectine, et les lectines.

12. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que le support est un support solide, non toxique et bio-compatible.

13. Composition selon la revendication 12 caractérisée en ce que le support est un support biologique.

14. Composition selon la revendication 13 caractérisée en ce que le support est choisi parmi le collagène réticulé, la poudre d'os, les polymères à base d'hydrates de carbone et les supports à base de calcaire.

15. Composition selon la revendication 12 caractérisée en ce que le support est choisi parmi les fibres de polytétrafluoroéthylène.

16. Procédé de préparation d'une composition selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que l'on effectue les étapes suivantes :

- a) on prélève un échantillon de tissu à partir d'un organisme,
- b) on isole et cultive in vitro les cellules désirées,
- c) on infecte les cellules obtenues en b) avec un adénovirus recombinant
- comprenant une séquence d'ADN hétérologue codant pour un produit thérapeutique,
- d) on incube les cellules infectées avec un milieu contenant un gélifiant,
- e) on dépose le mélange obtenu en d) sur un support, éventuellement après recouvrement de celui-ci par le gélifiant,
- f) on incube le mélange obtenu en e) dans des conditions permettant la
- gélification du gélifiant et l'ancrage des cellules sur le support, et
- g) on récupère la composition obtenue.



17. Méthode pour la libération d'un produit thérapeutique in vivo comprenant l'implantation d'une composition telle que définie dans l'une des revendications 1 à 15 dans laquelle la séquence d'ADN hétérologue code pour ledit produit thérapeutique.

5

18. Méthode de traitement de maladies résultant d'une déficience comprenant l'implantation d'une composition telle que définie dans l'une des revendications 1 à 15 dans laquelle la séquence d'ADN hétérologue code pour un produit thérapeutique apte à corriger ladite déficience.

10

19. Méthode selon la revendication 18 pour le traitement de la thalassémie, de déficiences en érythropoïétine (insuffisance rénale, etc), en hormone de croissance, en apolipoprotéines, en hormone thyroïdienne, ou en facteurs de coagulation.

15

20. Méthode selon l'une des revendications 17 à 19 caractérisée en ce que l'implantation est réalisée au niveau de la cavité péritonéale, dans le tissu sous-cutané (région sus-pubienne, fosses iliaques ou inguinales, etc), dans un organe, un muscle, une tumeur, le système nerveux central, ou encore sous une muqueuse.

1/1

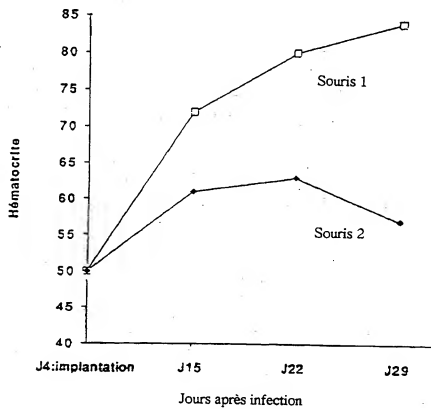


Figure 1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter- national Application No  
PCT/FR 94/01359

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/86 C12N5/10 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,89 07944 (AMERICAN NATIONAL RED CROSS) 8 September 1989 see page 9, line 6 - page 21, line 23 ---	1-20
Y	M/S-MEDICINE SCIENCES, vol.9, no.2, February 1993, HEIDELBERG, GERMANY pages 208 - 210 DANOS ET AL 'REIMPLANTATION DE CELLULES GENETIQUEMENT MODIFIEES DANS DES NEO-ORGANES VASCULARISES' see the whole document --- -/-	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "A" document number of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 March 1995

Date of mailing of the international search report

08. 03 95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nat Application No

PCT/FR 94/01359

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol.0,16PT F, 1992, NEW YORK,USA page 62 MOULLIER ET AL 'MURINE SKIN FIBROBLASTS AND BONE MARROW CELLS AS TARGETS FOR IN VIVO TRANSFER AND EXPRESSION OF THE HUMAN BETA-GLUCORONIDASE CDNA' * abrégé V421 *	1-20
Y	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol.S15F, 1991, NEW YORK,USA page 242 MOULLIER ET AL 'ORGANOID NEOVASCULAR STRUCTURE:EFFECTS OF VARIOUS MATRIX AND ANGIOGENIC FACTORS' abrégé CF 315 *	1-20
Y	WO,A,93 06223 (C.N.R.S.) 1 April 1993 see the whole document	1-20
Y -	FILE SERVER STN KARLSRUHE,FILE MEDLINE ABSTRACT NO.91284450 & CLIN EXP METASTASIS, (1991 MAY-JUN) 9(3) 231-43 BOGHAERT ET AL:'THE INFLUENCE OF THE PRESENCE OF ADENOVIRUS 5 E1A AND E1B SEQUENCES ON THE PATHOLOGY OF RAT EMBRYONIC FIBROBLASTS TRANSFECTED WITH ACTIVATED C-HA-RAS AND V-RAS' see abstract	1-20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR94/01359

**Box I** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Remark: Although Claims 17-20 are directed to a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the product (composition).
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II** Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of a additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/FR 94/01359

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8907944	08-09-89	AU-A- 4072189 EP-A- 0424386 JP-T- 3503167	22-09-89 02-05-91 18-07-91
WO-A-9306223	01-04-93	FR-A- 2681786 AU-A- 2790292 EP-A- 0559884 JP-T- 6502771	02-04-93 27-04-93 15-09-93 31-03-94

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Demr Internationale No  
 PCT/FR 94/01359

 A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
 CIB 6 C12N15/86 C12N5/10

A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

 Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
 CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO, A, 89 07944 (AMERICAN NATIONAL RED CROSS) 8 Septembre 1989 voir page 9, ligne 6 - page 21, ligne 23 ---	1-20
Y	M/S-MEDICINE SCIENCES, vol. 9, no. 2, Février 1993, HEIDELBERG, GERMANY pages 208 - 210 DANOS ET AL 'REIMPLANTATION DE CELLULES GENETIQUEMENT MODIFIEES DANS DES NEO-ORGANES VASCULARISEES' voir le document en entier --- -/-	1-20

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent  
 "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date  
 "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)  
 "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens  
 "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention  
 "X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément  
 "Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier  
 "A" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

1 Mars 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

08.03.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale:

 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tlx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Sitch, W

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol.0,16PT F, 1992, NEW YORK,USA page 62 MOULLIER ET AL 'MURINE SKIN FIBROBLASTS AND BONE MARROW CELLS AS TARGETS FOR IN VIVO TRANSFER AND EXPRESSION OF THE HUMAN BETA-GLUCURONIDASE CDNA' * abrégé V421 *</p> <p>---</p>	1-20
Y	<p>JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol.S15F, 1991, NEW YORK,USA page 242 MOULLIER ET AL 'ORGANOID NEOVASCULAR STRUCTURE:EFFECTS OF VARIOUS MATRIX AND ANGIOGENIC FACTORS' abrégé CF 315 *</p> <p>---</p>	1-20
Y	<p>WO,A,93 06223 (C.N.R.S.) 1 Avril 1993 voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-20
Y	<p>FILE SERVER STN KARLSRUHE,FILE MEDLINE ABSTRACT NO.91284450 &amp; CLIN EXP METASTASIS, (1991 MAY-JUN) 9(3) 231-43 BOGHAERT ET AL:'THE INFLUENCE OF THE PRESENCE OF ADENOVIRUS 5 E1A AND E1B SEQUENCES ON THE PATHOLOGY OF RAT EMBRYONIC FIBROBLASTS TRANSFECTED WITH ACTIVATED C-HA-RAS AND V-RAS' voir abrégé</p> <p>-----</p>	1-20



**Cadre I** (Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point I de la première feuille))

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n<sup>es</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:  
Remarque: Bien que les revendications 17-20 concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit (à la composition).
2. ☐ Les revendications n<sup>es</sup> sont des revendications de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n<sup>es</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4-a).

**Cadre II** Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>es</sup>:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>es</sup>:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dew : Internationale No

PCT/FR 94/01359

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets(s)	Date de publication
WO-A-8907944	08-09-89	AU-A- 4072189	22-09-89
		EP-A- 0424386	02-05-91
		JP-T- 3503167	18-07-91
-----			
WO-A-9306223	01-04-93	FR-A- 2681786	02-04-93
		AU-A- 2790292	27-04-93
		EP-A- 0559884	15-09-93
		JP-T- 6502771	31-03-94
-----			